

· 医药生物技术 ·

# 非共生发光杆菌毒力基因簇激活 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路促进细菌对巨噬细胞的侵袭

王霞\*, 申嘉玮\*, 苏浩翔, 刘立国, 江峰

中国医学科学院北京协和医学院病原生物学研究所 国家卫生健康委员会病原系统生物学重点实验室, 北京 100176

王霞, 申嘉玮, 苏浩翔, 等. 非共生发光杆菌毒力基因簇激活 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路促进细菌对巨噬细胞的侵袭. 生物工程学报, 2021, 37(11): 4056-4065.

Wang X, Shen JW, Su HX, et al. *Photorhabdus* virulence cassette promotes bacterial invasion into macrophages by activating NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathway. Chin J Biotech, 2021, 37(11): 4056-4065.

**摘要:** 发光杆菌是一种来自肠杆菌科的革兰氏阴性细菌, 一般情况下与昆虫或线虫共生。除了作为昆虫病原体的角色, 一种名为非共生发光杆菌 (*Photorhabdus asymbiotica*, Pa) 的物种在世界各地能引起人体组织的感染。然而, 这种跨界感染的分子机制目前尚未有深入研究。本论文通过探究非共生发光杆菌毒力装置 (PVC) 对于真核细胞的影响, 对其感染机制进行阐释。首先, RNA 测序和 qPCR 等研究数据表明, 在 PVC 处理的哺乳动物巨噬细胞中, NF- $\kappa$ B 和 MAPK 通路被强烈激活。进而本研究在细胞水平通过 Western blotting 等方法对 PVC 处理引起的 MAPK 信号通路激活的现象进行多重验证。NF- $\kappa$ B 活性的检测以及 p65 蛋白核移位的实验结果证实了巨噬细胞经 PVC 处理后产生的 NF- $\kappa$ B 活化作用。此外, PVC 处理早期也能促进巨噬细胞对细菌的吞噬作用, 而细胞骨架聚合抑制剂能抑制这种吞噬作用。结果表明, PVC 通过激活 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路参与细菌对巨噬细胞的侵袭作用, 这将为分析 Pa 在人类感染中的致病性提供新的思路。

**关键词:** 非共生发光杆菌, 非共生发光杆菌毒力装置, 巨噬细胞, 胞吞作用, 信号通路

**Received:** February 20, 2021; **Accepted:** March 27, 2021

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 32000080, 31870108, 32070081), the Beijing Natural Science Foundation, China (No. 5192019), the CAMS Innovation Fund for Medical Sciences, China (No. 2016-I2M-1-013), the Non-Profit Central Institute Fund of Chinese Academy of Medical Sciences, China (Nos. 2017PT31049, 2018PT51009, 2018PT31012).

**Corresponding author:** Feng Jiang. Tel: +86-10-67877731; E-mail: jiangf@ipbcams.ac.cn

\*These authors contributed equally to this study.

国家自然科学基金 (Nos. 32000080, 31870108, 32070081), 北京自然科学基金 (No. 5192019), 中国医学科学院医学创新工程 (No. 2016-I2M-1-013), 中国医学科学院基本科研业务费 (Nos. 2017PT31049, 2018PT51009, 2018PT31012) 资助。

网络出版时间: 2021-05-06

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210506.0747.001.html>

# *Photorhabdus* virulence cassette promotes bacterial invasion into macrophages by activating NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathway

Xia Wang<sup>\*</sup>, Jiawei Shen<sup>\*</sup>, Haoxiang Su, Liguang Liu, and Feng Jiang

NHC Key Laboratory of Systems Biology of Pathogens, Institute of Pathogen Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100176, China

**Abstract:** *Photorhabdus* is a Gram-negative bacterium from the family Enterobacteriaceae that lives in a symbiotic association with nematode or insects. In addition to the role of being insect pathogens, one species called *Photorhabdus asymbiotica* (Pa) causes human infection around the world. Nevertheless, how does this transkingdom infection occur remains elusive. Here we focus on one pathogenic determinant called *Photorhabdus* virulence cassette (PVC) that is founded in the Pa genome and many other pathogens. The RNA-seq and qPCR data showed that the NF- $\kappa$ B and MAPK pathways were drastically activated in the PVC-treated mammalian macrophages. Western blotting assays using samples treated with various inhibitors of the affected pathways confirmed the results we have observed for MAPK pathway previously. p65 translocation assays validated the NF- $\kappa$ B activation in the macrophages after PVC treatment. Moreover, the bacterial phagocytosis by macrophage was also promoted by PVC at the early stage, and this phagocytosis was inhibited by cytoskeleton inhibitors. Thus, the results indicated that PVC is involved in the bacterial invasion by activating NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathway, providing a new perspective for analyzing the pathogenicity of Pa in human infections.

**Keywords:** *Photorhabdus asymbiotica*, *Photorhabdus* virulence cassette, macrophage, phagocytosis, signaling pathway

自然界中的微生物在进化过程中获得了多种多样的分子机制，使其在复杂的生物环境中得以生存。其中，可伸缩注射系统 (Contractile injection systems, CISs) 便是微生物适应环境生存竞争的“武器”之一，该系统可以帮助微生物将多种效应分子转运至胞外以使其获得生存优势<sup>[1]</sup>。其中细菌六型分泌系统 (Type VI secretion system, T6SS) 是当前研究比较深入的 CISs 之一，其结构、装配和作用机制均已得到详尽的阐释<sup>[2]</sup>。

此外，在细菌和古细菌中还发现有一种细胞外 CISs (Extracellular CISs, eCISs)，eCISs 自身可被释放至胞外并发挥作用。作为一种重要的 eCIS，发光杆菌属 (*Photorhabdus* spp.) 中的毒力装置 *Photorhabdus* virulence cassette (PVC) 已经被证明可以作用于真核细胞并将效应蛋白注射至昆虫血细胞中，并且对昆虫细胞产生毒性<sup>[3-4]</sup>。随着研究的深入，PVC 的结构和功能越来越引起国际同行的兴趣。

2019 年本课题组报道了非共生发光杆菌

*Photorhabdus asymbiotica* ATCC43949 中 PVC 的装置结构，其中部分区域的最高分辨率达到了 2.9 Å，并且对其组装机制进行了深入的研究<sup>[5]</sup>。此后又对 PVC 基因簇下游 *RRSP<sub>Pa</sub>* 基因编码蛋白在真核生物中的功能进行了详尽的阐释<sup>[6]</sup>。在此基础上，课题组进一步对 PVC 装置自身在真核生物中的功能展开探究。本研究首先通过 PVC 对巨噬细胞转录水平的影响探寻相关线索，初步推测 PVC 与巨噬细胞中真核细胞中的核因子 kappa B (Nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B) 和丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路的激活相关。NF- $\kappa$ B/MAPK 信号通路广泛参与多种动物组织细胞的炎症反应、细胞凋亡等基因转录的调节过程，当细胞受到外来因素刺激时 (如脂多糖、细菌微生物感染、组织损伤等)，该信号通路被激活为有活性的二聚体形式，调节靶基因的表达，最终调控炎症反应<sup>[7-8]</sup>。

本研究从多个方面对 PVC 的功能进行探究，发现 PVC 可激活巨噬细胞中的 NF- $\kappa$ B/MAPK 信

号通路, 进而促进巨噬细胞的胞吞能力, 初步揭示了 PVC 在真核中的作用机制, 为进一步的研究和应用奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞系和菌株

鼠源巨噬细胞 RAW264.7 为本实验室长期保存; NF- $\kappa$ B 活性报告细胞 (Raw and THP-1 Dual, IRF-Lucia and MIP-2-SEAP macrophage reporter cell line) 购自 Invivogen 公司。发光杆菌 Pa ATCC43949 和大肠杆菌 DH5 $\alpha$  均为本实验室保存菌株。

#### 1.1.2 实验试剂

分子生物学试剂: 分子克隆所用 DNA 聚合酶、DNA 内切酶、连接酶购自 Fermentas 公司; PCR 产物回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、RNA 逆转录试剂盒及 qPCR 试剂盒购自 QIAGEN 公司; RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司。

细胞生物学试剂: DMSO、RPMI 1640、胰酶、抗生素均购自 Hyclone 公司; 胎牛血清购自 Gibco 公司; 细胞胞浆/细胞核分离试剂盒购自华兴博创公司; 大肠杆菌 BioParticles<sup>®</sup>细胞吞噬结合物试剂盒购自 Invitrogen 公司; 细胞松弛素 D 购自 Sigma 公司。

抗体: 兔抗 p-IKK $\alpha$  $\beta$  抗体、兔抗 IKK $\alpha$  抗体、兔抗 IKK $\beta$  抗体、兔抗 I $\kappa$ B $\alpha$  抗体、兔抗 p-NF- $\kappa$ B p65 抗体、兔抗 NF- $\kappa$ B p65 抗体、兔抗 GAPDH 抗体购自 Cell signaling technology 公司; HRP 标记的山羊抗兔的二抗购自华兴博创公司。

抑制剂: MEK 的抑制剂 Trametinib、TAK1 的抑制剂 NG25、p38 的抑制剂 SB203580 和 JNK 的抑制剂 SP600125 均购自 MCE 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 细胞培养

巨噬细胞培养于添加 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱

中培养, 待细胞生长至 70% 密度时, 使用 PVC 对其进行处理。

#### 1.2.2 PVC 的表达、纯化及鉴定

将表达有 PVC 基因簇的 *E. coli* 在 30  $^{\circ}$ C 培养 24 h, 收集并裂解菌体, 后使用分步超速离心收集 PVC 复合物。随后将收集到的 PVC 溶液与购自 JNC 公司的 Cellufine ET Clean L 凝胶室温混匀 2 h 后离心, 以去除 PVC 溶液中的残余内毒素。然后将纯化后的 PVC 进行负染色及电镜观察, 将收集到的 PVC 复合物置于载网, 负染后进行电镜观察并收集数据。

#### 1.2.3 RNA-seq 以及 qRT-PCR 的验证

使用纯化后的 PVC 装置处理鼠源巨噬细胞 RAW264.7, 处理时间为 2 h, 同时以未处理组作为对照, 通过高通量测序分别测定巨噬细胞的转录组。然后针对转录组结果中出现明显表达上调的基因设计引物进行 qRT-PCR, 以对高通量结果进行进一步验证。

#### 1.2.4 Western blotting

首先将 PVC 处理后的巨噬细胞 RAW264.7 及 U937 使用 RIPA 裂解液裂解细胞并提取细胞的总蛋白, BCA 试剂盒测定各组样品蛋白浓度, 加入蛋白上样缓冲液煮沸备用。蛋白经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳后转膜, BSA 封闭后分别使用关键蛋白的抗体和磷酸化抗体作为一抗。该实验中分别使用兔抗 p-IKK $\alpha$  $\beta$  抗体、兔抗 IKK $\alpha$  抗体、兔抗 IKK $\beta$  抗体、兔抗 I $\kappa$ B $\alpha$  抗体、兔抗 NF- $\kappa$ B p65 抗体、兔抗 GAPDH 抗体等为一抗, HRP 标记的山羊抗兔的二抗进行检测。

#### 1.2.5 细胞核质分离

使用 PVC 处理细胞后, 使用细胞胞浆/细胞核分离试剂盒进行胞浆和细胞核的提取和分离, 然后通过 Western blotting 实验分别测定全细胞、胞浆、细胞核中 p65 和 Lamin B1 的含量。

#### 1.2.6 巨噬细胞核移位的测定

将巨噬细胞接种于玻底培养皿中, 待长到适当浓度后使用 PVC 处理细胞, 同时以无处理组为

对照, 2 h 后使用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤, 加兔抗人 NF- $\kappa$ B p65 多克隆抗体, 4 °C 孵育过夜, PBS 洗 3 次。然后加入稀释的山羊抗兔 TRITC IgG (二抗), 37 °C 暗湿盒中温育 1 h, PBS 洗 3 次, 加入稀释的 DAPI 染细胞核, PBS 洗 3 次, 随后置于 Leica 共聚焦显微镜下观察, 最后用 ImagJ 定量软件观察和测定细胞内荧光的变化。

### 1.2.7 NF- $\kappa$ B 转录激活测定

使用 PVC 溶液处理带有 NF- $\kappa$ B 启动子的巨噬细胞 RAW264.7 Dual 及 THP-1 Dual (处理时间分别为 15 min、30 min), 以无处理组为对照, 通过检测细胞上清培养液中的分泌型碱性磷酸酶活性来确定 NF- $\kappa$ B 启动子的激活情况。

### 1.2.8 巨噬细胞胞吞能力的检测

使用 PVC 装置处理巨噬细胞 (处理时间分别为 2 h 和 4 h), 以无处理组为对照, 使用大肠杆菌 BioParticles<sup>®</sup> 细胞吞噬结合物试剂盒完成巨噬细胞胞吞作用的检测, 并拍摄相应时间的显微图片。

## 2 结果与分析

### 2.1 成熟 PVC 颗粒的表达纯化及生物信息学分析

以非共生发光杆菌的基因组 (图 1A) 为模板, 并利用 CATCH 方法构建的质粒 pCNM3<sup>[5,9]</sup> 转入大肠杆菌 EPI300 菌株中。然后经过富集裂解菌体和超速离心等步骤得到纯化的成熟 PVC 颗粒, 并经过负染电子显微镜进行样品观察, 确定得到了正确的 PVC 蛋白溶液 (图 1B)。随后, 本研究对 PVC 的一个关键组分外鞘蛋白 Pvc2 及其类似蛋白进行了生物信息学分析, 从多个包括 PVC、AFP、T6SS、R-type pyocin 和 T4 噬菌体等结构的相应组分进行分析发现, PVC 与 R-type pyocin 具有更接近的进化上的关系, 而与 T4 噬菌体的进化关系更远 (图 1C)。

### 2.2 PVC 颗粒对巨噬细胞信号通路的影响

使用纯化的 PVC 蛋白溶液刺激培养的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 后, 提取相应细胞的总 RNA 并反转录成 cDNA 进行 RNA 转录组检测。同时

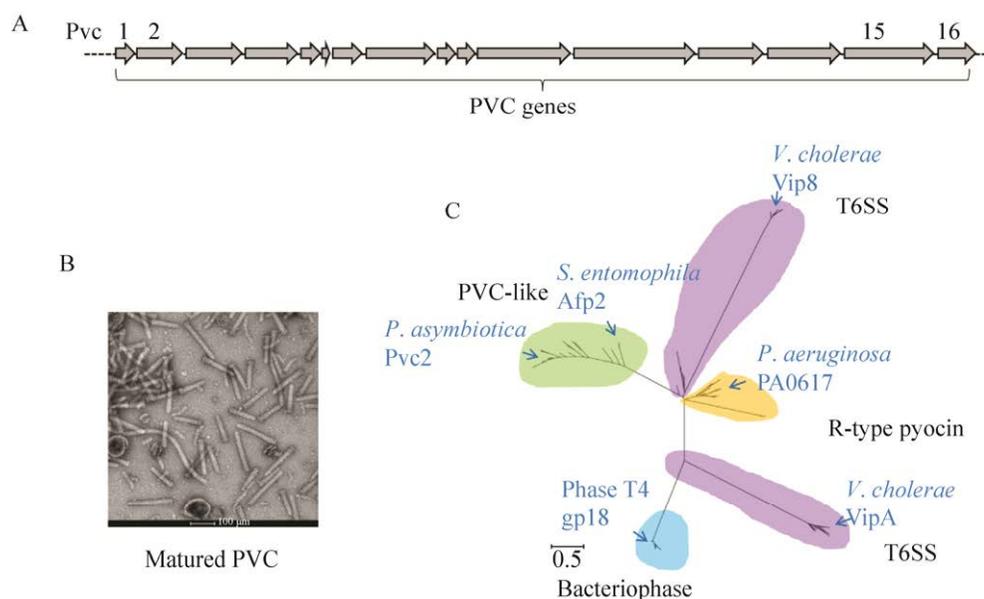


图 1 PVC 基因簇示意图 (A) 成熟结构 (B) 及与类似结构的进化关系 (C)

Fig. 1 Gene locus of PVC cluster (A) in Pa chromosome, matured PVC particles (B) and its evolutionary relationship with other similar structures (C). *P. asymbiotica*: *Photorhabdus asymbiotica*; *S. entomophila*: *Serratia entomophila*; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *V. cholerae*: *Vibrio cholerae*; T6SS: type 6 secretion system.

提取未被处理的细胞 (UT, untreated) 总 RNA 作为对照。结果显示, PVC 能显著提高巨噬细胞内 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路的细胞因子转录水平, 其中 *fos*、*tnf*、*jun* 及 *nfkbia* 等基因的表达上调更为明显 (图 2A)。为了更进一步确定相应基因的表达情况, 随后用 qRT-PCR 对反转录得到的 cDNA 进行了进一步的检测。结果表明在 PVC 处理的细胞组中, *illb*、*fos*、*tnf*、*jun* 及 *nfkbia* 等基因的转录本数量的确发生了十分明显的上升 (图 2B), 这就更确定了之前在 RNA-seq 中所得到的结论。

### 2.3 PVC 颗粒提高 MAPK 及 NF- $\kappa$ B 通路细胞因子的磷酸化水平

一般来说, 许多蛋白激酶的磷酸化是信号通路激活的重要指标。其中 Erk1/2、JNK1/2/3 及 p38 蛋白是 MAPK 通路的关键蛋白激酶, 而 IKK 及 I $\kappa$ B $\alpha$  则在 NF- $\kappa$ B 通路中扮演了重要的角色。为了进一步检测 PVC 是如何影响 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路的, 本研究对相关信号通路的上述关键蛋白激酶的磷酸化水平进行了 Western blotting 检测。结果表明, 在 RAW264.7 细胞中, MAPK 通路的 Erk1/2、JNK1/2/3 及 p38 蛋白的磷酸化水平在 PVC 处理后

都得到了较大的提高, 而它们的总蛋白水平基本没有变化 (图 3A)。同样地, IKK 和 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的磷酸化水平也显著上升, 并且总 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白在 PVC 处理初期发生了下降, 这都提示了 PVC 对 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活作用。本研究随后选取人类的巨噬细胞 U937 进行了类似的实验, 并得到了和小鼠巨噬细胞中相近的结果 (图 3B)。因此, 本研究认为 PVC 是通过提高 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 途径中关键蛋白激酶的磷酸化水平来激活相应的信号通路。

### 2.4 抑制剂处理进一步验证 PVC 在巨噬细胞 NF- $\kappa$ B/MAPK 信号通路中的功能

在初步确定 PVC 对 NF- $\kappa$ B/MAPK 信号通路的激活作用之后, 为了进一步验证 PVC 的作用并探寻 PVC 在该通路中的具体作用位点, 本研究分别在细胞培养基中加入 MAPK 信号通路靶点的抑制剂, 进而使用 PVC 处理, 检测通路中关键蛋白的总体水平和磷酸化水平。使用 MEK 的抑制剂 Trametinib、TAK1 的抑制剂 NG25、p38 的抑制剂 SB203580 和 JNK1/2/3 的抑制剂 SP600125 分别处理细胞, 然后检测 NF- $\kappa$ B/MAPK 信号通路的情况。结果如图 4 所示, 使用 MAPK 通路关键

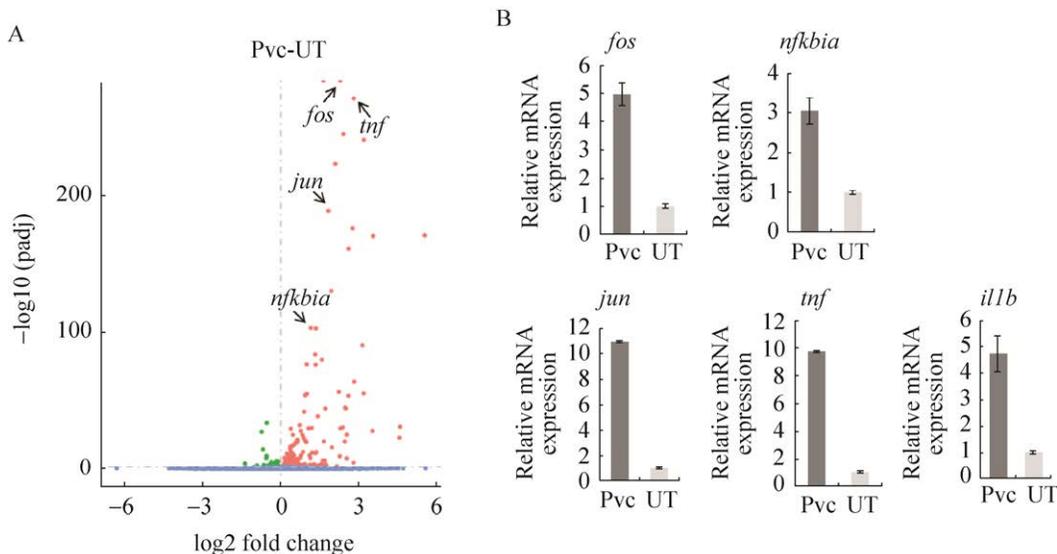


图 2 PVC 处理小鼠巨噬细胞 RAW264.7 前后转录组变化

Fig. 2 PVC activates NF- $\kappa$ B and MAPK pathways in RAW264.7 macrophages. (A) Volcano plot of transcriptional changes in PVC-treated versus PVC-untreated RAW264.7 cells. (B) qRT-PCR verification of the activated transcripts in (A). UT: untreated.

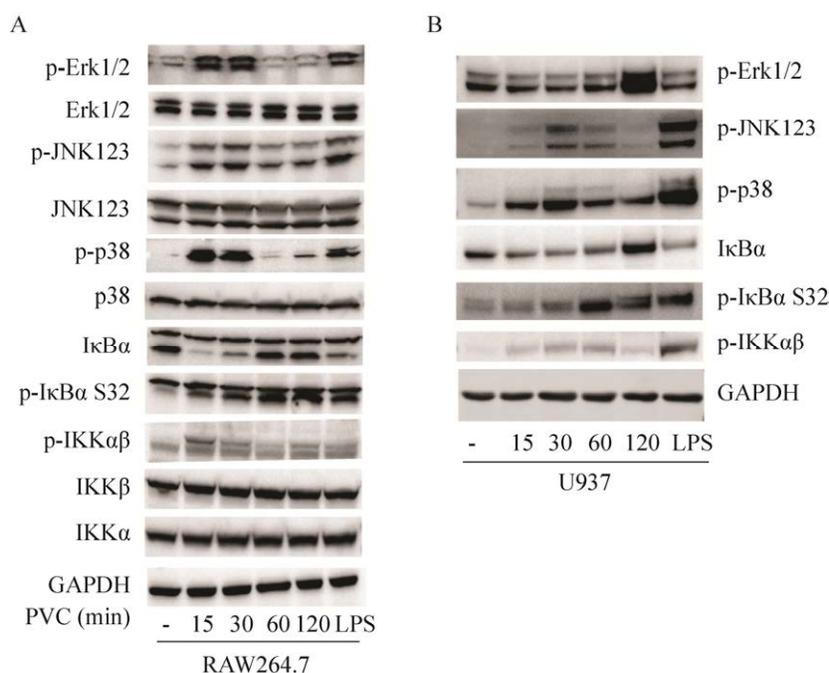


图 3 PVC 上调 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路的磷酸化水平

Fig. 3 Activation of PVC on the MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways in macrophages. (A) The RAW264.7 cells were pretreated with PVC for the indicated time and Western blotting was performed to detect the phosphorylated and total proteins. (B) Similar experiments were performed as in (A) and the protein expression was detected in U937 cells.

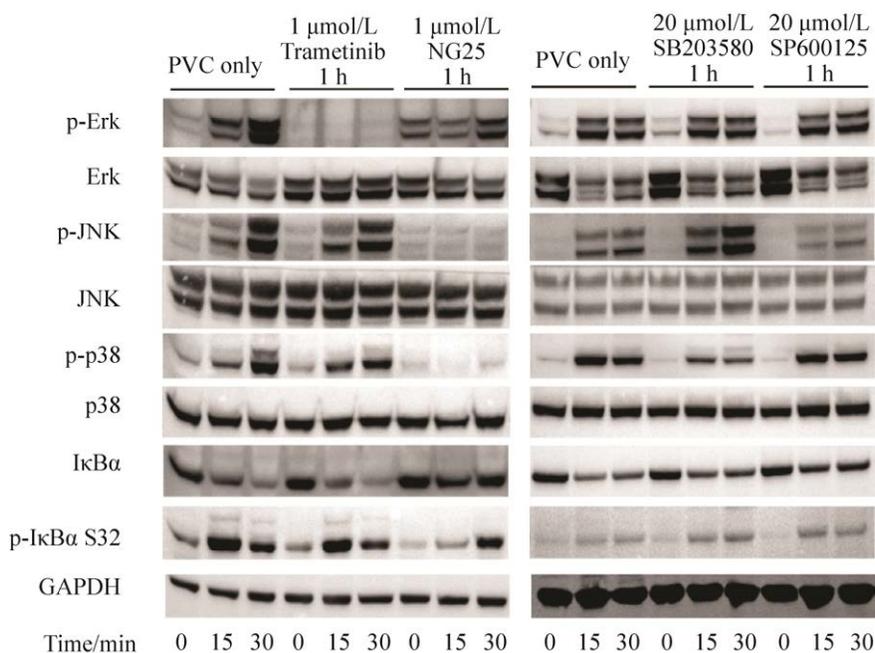


图 4 多种抑制剂处理后 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路的变化

Fig. 4 Comparison of the protein expression changes in the MAPK and NF- $\kappa$ B pathways after treatments with diverse inhibitors.

蛋白激酶抑制剂处理细胞后, PVC 对 ERK、p38、JNK 的激活被抑制, 这验证了 PVC 对 MAPK 通路的激活作用。而经典的 NF- $\kappa$ B 通路关键蛋白 I $\kappa$ B $\alpha$  的磷酸化水平也受到 NG25 抑制剂的影响, 这表明该信号途径同样受到了 PVC 的作用。

## 2.5 PVC 可促进巨噬细胞中 p65 蛋白的核移位并提高 NF- $\kappa$ B 的活性

基于 p65 蛋白的核移位是 NF- $\kappa$ B 信号通路激活的主要方式之一, 本研究在细胞水平检测了 PVC 对巨噬细胞中 p65 核移位的影响。分别对无处理组 and PVC 组细胞进行胞浆和细胞核的分离, 然后通过 Western blotting 检测 PVC 处理后 p65 在细胞胞浆和细胞核中蛋白量的变化。实验结果表明 (图 5A), 无处理组细胞中 p65 蛋白主要存在

于细胞胞浆中, 而 PVC 组细胞中 p65 蛋白出现了明显的核转移现象。该结果初步表明, PVC 可促进细胞中 p65 的核移位, 进而激活 NF- $\kappa$ B 信号通路。

本研究进而使用 PVC 处理 NF- $\kappa$ B 活性报告细胞 (Dual IRF-Lucia、MIP-2-SEAP murine macrophage reporter cell line), 并通过测定荧光素酶分泌型碱性磷酸酶 (Secreted alkaline phosphatase, SEAP) 强度来确定细胞内 NF- $\kappa$ B 的活性。实验结果表明 (图 5B-C), 与无处理组相比, PVC 处理后巨噬细胞 RAW264.7 Dual 和 THP-1 Dual 内 NF- $\kappa$ B 的活性显著提高, 这进一步确定了 PVC 对细胞 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活。本研究同时还进行了共聚焦显微镜的观测, 相应结果验证了 PVC 细胞中 p65 的核移位现象 (图 5D-E)。

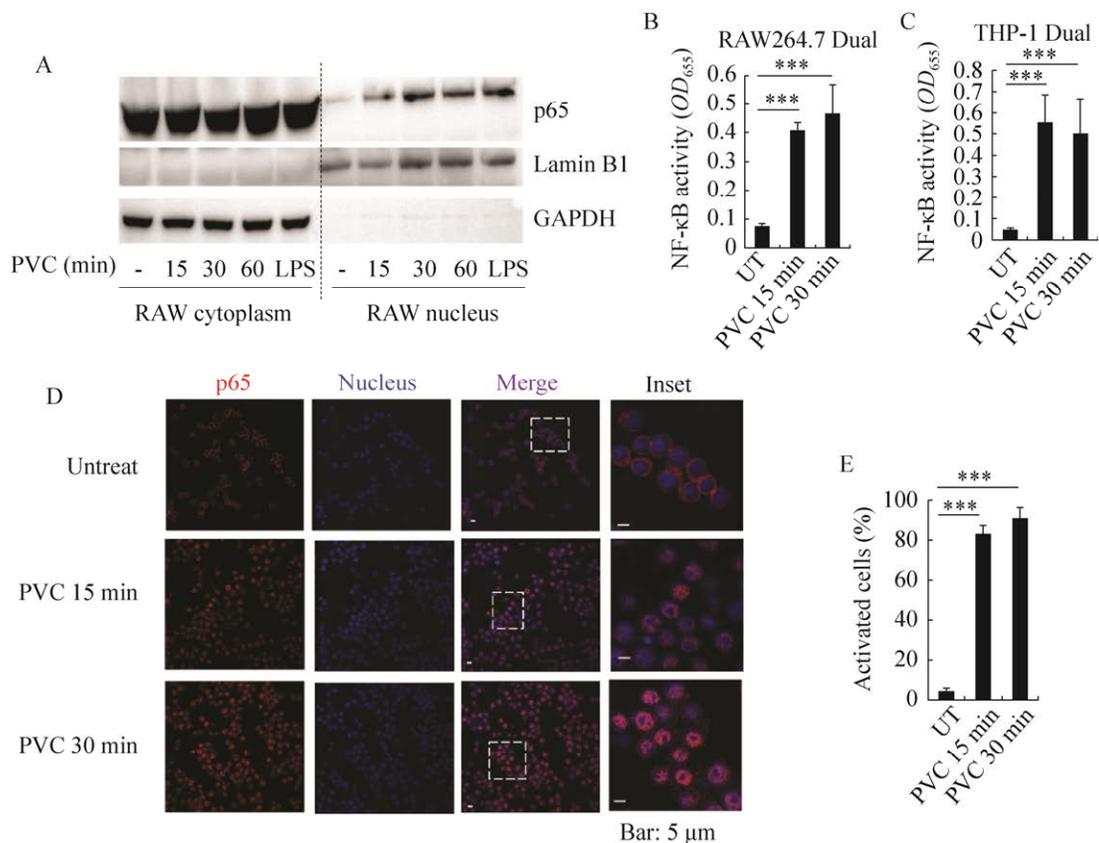


图 5 p65 蛋白核转移情况检测

Fig. 5 p65 translocation assays after PVC treatment. (A) The cytosol and nucleus of RAW264.7 cells were separated and the relevant proteins were detected. (B-C) The NF- $\kappa$ B activities were tested in PVC-treated RAW264.7 and THP-1 carrying NF- $\kappa$ B promoter. (D) Confocal microscopy observation of the p65 translocation into RAW264.7 nucleus after PVC treatment. (E) The activated cells (p65 in nucleus) in (D) were calculated. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

## 2.6 PVC 可促进巨噬细胞的胞吞作用

细胞的胞吞是细胞将细胞外基质、病毒、微生物或纳米粒子运送到细胞内部的一个重要生理过程。本研究首先使用 PVC 装置处理巨噬细胞(处理时间分别为 2 h 和 4 h), 或者 TAK1 (控制 NF- $\kappa$ B/MAPK 信号通路的蛋白激酶) 的抑制剂 NG25, 与无处理组对照检测细胞胞吞作用的变化。此外, 作为肌动蛋白聚合抑制剂, 细胞松弛素 D (Cytochalasin D, Cyto D) 可抑制巨噬细胞的胞吞作用, 因此使用 Cyto D 处理细胞作为对照进一步验证 PVC 对巨噬细胞胞吞作用的影响。结果表明 (图 6A), PVC 处理 2 h 和 4 h 后, 巨噬细胞胞内荧光强度均显著高于无处理组, 而加入 NG25 或者 Cyto D 后无论是否进行 PVC 处理其荧光强度均低于无处理组, 这表明 PVC 可促进巨噬细胞的胞吞能力, 而这种能力是通过激活 NF- $\kappa$ B/MAPK 信号通路而实现的。进而使用荧光显微镜对巨噬细胞进行观测 (图 6B), 结果表明, PVC 组 (PVC 处理 2 h) 细胞的荧光亮度显著高于无处理组、NG25 组和 Cyto D 组, 这进一步验证了 PVC 对于细胞胞吞能力的促进作用。

## 3 讨论

作为一种 eCIS, PVC 已被证明可将效应蛋白转运至真核细胞中发挥毒力作用, 而 PVC 本身对于真核细胞的影响目前尚无报道, 本课题将针对这一科学问题进行深入探究。

近年来关于细菌分泌系统对 NF- $\kappa$ B/MAPK 信号通路的影响也引起了国际上的广泛关注。研究表明, 类鼻疽伯克氏菌 *Burkholderia pseudomallei* 可通过细菌的三型分泌系统 (Type III secretion system, T3SS) 激活真核细胞 HEK293T 中的 NF- $\kappa$ B 信号通路<sup>[10]</sup>; 此外 MAPK 通路被证明可调控多种动物个体发育的变态过程<sup>[11-12]</sup>, *P. luteoviolacea* 即可通过其 eCIS (即 MAC 装置) 调控激活华美盘管虫 *Hydroides elegans* 中的 MAPK 信号通路, 进而影响其发育变态的过程<sup>[13]</sup>。本研究通过 PVC 对巨噬细胞转录水平的影响探寻相关线索, 初步推测 PVC 与细胞中 NF- $\kappa$ B/MAPK 信号通路的激活相关。进而在细胞水平从多个方面对该假设进行验证, 随后对 PVC 是否可通过 NF- $\kappa$ B/MAPK 信号通路影响巨噬细胞的胞吞能力进行探究, 为深

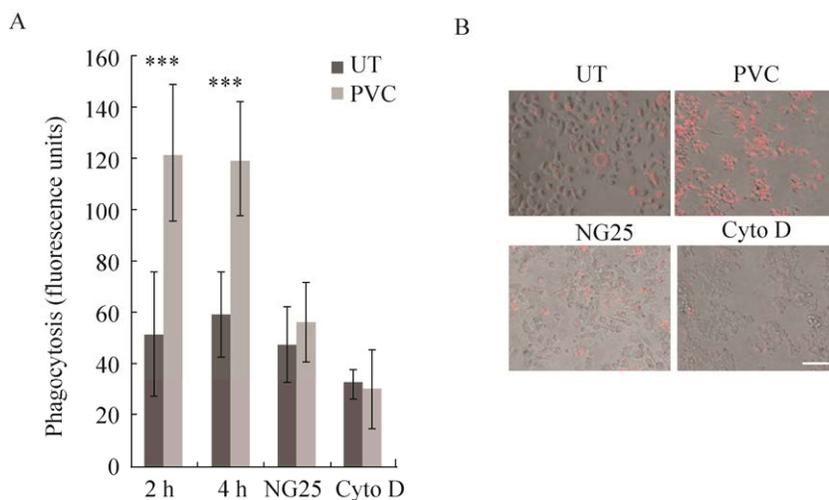


图 6 巨噬细胞吞噬功能比较分析

Fig. 6 PVC treatments promote bacterial phagocytosis by RAW264.7 macrophage. (A) The phagocytosis of *E. coli* by macrophages treated with PVC for 2 h and 4 h. (B) The representative pictures of 2 h samples in (A). Bar 50  $\mu$ m. Cyto D: cytochalasin D. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

入研究 PVC 在真核生物中的功能提供了可靠的线索和思路。

先前有研究表明,细胞外刺激物可通过 NF- $\kappa$ B/MAPK 信号通路促进巨噬细胞的胞吞作用<sup>[14-15]</sup>。在本研究中也发现, PVC 的刺激可促进巨噬细胞的胞吞能力,并且其分子机制与 NF- $\kappa$ B/MAPK 信号通路有关。鉴于目前在国际上尚无关于 PVC 装置自身与真核细胞相互作用机制的相关报道,而此前有研究表明 *P. asymbiotica* 可以被巨噬细胞所吞噬,随后在细胞内复制并诱导宿主细胞凋亡<sup>[16]</sup>。此外,还有研究表明使用 *P. luteoviolacea* 中的 MAC 装置处理鼠巨噬细胞 J774A.1 后会导致巨噬细胞的死亡<sup>[17]</sup>。基于以上研究基础,本课题首先选择小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 作为 PVC 与真核细胞作用的研究对象。在哺乳动物中,巨噬细胞是维持宿主稳定的主要功能细胞,通过增强免疫应答对宿主的感染作出反应。研究表明,细菌侵染能诱导巨噬细胞发生明显的表型变化,分泌大量的炎性因子和介质,激活一系列的细胞信号通路。因此研究 PVC 对于巨噬细胞的功能具有重要意义。在后续的工作中,本课题组还将在其他真核细胞系中(包括人外周血单核细胞系 THP-1、人宫颈癌细胞 HeLa、人肾上皮细胞系 HEK293T 等)验证 PVC 对细胞作用的普遍性。此外还将利用 lambda Red 重组技术敲除 Pa ATCC43949 中 *PvcI* 基因,以野生型菌株为对照,在细菌的生理水平从各个方面检测 NF- $\kappa$ B/MAPK 通路的变化,如 NF- $\kappa$ B 的活性、NF- $\kappa$ B/MAPK 通路关键节点蛋白的变化以及 PVC 的敲除对巨噬细胞胞吞能力的影响等。

综上所述,本研究首先通过转录组学的研究发现 PVC 与巨噬细胞中 NF- $\kappa$ B/MAPK 信号通路的激活相关,进而在细胞水平从多个方面进行验证,包括确定 MAPK 信号通路的关键蛋白的变化,通过抑制剂处理验证 PVC 在 NF- $\kappa$ B/MAPK 信号通路中的功能,以及 PVC 对 NF- $\kappa$ B 活性以及核移位的影响。此外,本研究还发现 PVC 可通过

NF- $\kappa$ B/MAPK 信号通路影响巨噬细胞的胞吞能力。本研究初步揭示了 PVC 在真核细胞中的作用机制,研究表明 PVC 不仅可以作为一种转运装置将效应蛋白注射于真核细胞中,其装置自身对于真核细胞也有重要的影响,这丰富了对 PVC 及其作用机制的认识,为致病性细菌的预防和干预治疗提供参考。鉴于 CISs 在微生物中的广泛存在,本研究为 CISs 介导的细菌-真核生物相互作用提供了新的研究思路和基础。

## REFERENCES

- [1] Taylor NMI, van Raaij MJ, Leiman PG. Contractile injection systems of bacteriophages and related systems. *Mol Microbiol*, 2018, 108(1): 6-15.
- [2] Brackmann M, Nazarov S, Wang J, et al. Using force to punch holes: mechanics of contractile nanomachines. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(9): 623-632.
- [3] Yang G, Dowling AJ, Gerike U, et al. Photorhabdus virulence cassettes confer injectable insecticidal activity against the wax moth. *J Bacteriol*, 2006, 188(6): 2254-61.
- [4] Ge P, Scholl D, Leiman PG, et al. Atomic structures of a bactericidal contractile nanotube in its pre- and postcontraction states. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(5): 377-82.
- [5] Jiang F, Li N, Wang X, et al. Cryo-EM structure and assembly of an extracellular contractile injection system. *Cell*, 2019, 177(2): 370-383 e15.
- [6] Wang X, Shen J, Jiang F, et al. The photorhabdus virulence cassettes RRSP-like effector interacts with cyclin-dependent kinase 1 and causes mitotic defects in mammalian cells. *Front Microbiol*, 2020, 11: 366.
- [7] Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappa B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(4): a000034.
- [8] Dos Santos LAM, Rodrigues GB, Mota FVB, et al. New thiazolidinedione LPSF/GQ-2 inhibits NF-kappa B and MAPK activation in LPS-induced acute lung inflammation. *Int Immunopharmacol*, 2018, 57: 91-101.

- [9] Jiang W, Zhao X, Gabrieli T, et al. Cas9-assisted targeting of chromosome segments CATCH enables one-step targeted cloning of large gene clusters. *Nat Commun*, 2015, 6: 8101.
- [10] Teh BE, French CT, Chen Y, et al. Type three secretion system-mediated escape of *Burkholderia pseudomallei* into the host cytosol is critical for the activation of NF-kappa B. *BMC Microbiol*, 2014, 14: 115.
- [11] Aguilar C, Raina J, Foret S, et al. Transcriptomic analysis reveals protein homeostasis breakdown in the coral *Acropora millepora* during hypo-saline stress. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 148.
- [12] Shikuma N, Antoshechkin I, Medeiros JM, et al. Stepwise metamorphosis of the tubeworm *Hydroides elegans* is mediated by a bacterial inducer and MAPK signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(36): 10097-102.
- [13] Wang H, Qian PY, Involvement of a novel p38 mitogen-activated protein kinase in larval metamorphosis of the polychaete *Hydroides elegans* (Haswell). *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2010, 314(5): 390-402.
- [14] Chen H, Fu W, You S, et al. Magnolol attenuates the inflammation and enhances phagocytosis through the activation of MAPK, NF-kappa B signal pathways *in vitro* and *in vivo*. *Mol Immunol*, 2019, 105: 96-106.
- [15] Zhu Y, Fan S, Wang N, et al. Melatonin inhibits apoptotic cell death induced by *Vibrio vulnificus* VvhA via melatonin receptor 2 coupling with NCF-1. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 48.
- [16] Costa SC, Girard PA, Brehelin M, et al. The emerging human pathogen *Photorhabdus asymbiotica* is a facultative intracellular bacterium and induces apoptosis of macrophage-like cells. *Infect Immun*, 2009, 77(3): 1022-1230.
- [17] Rocchi I, Ericson CF, Malter KE, et al. A bacterial phage Tail-like structure kills eukaryotic cells by injecting a nuclease effector. *Cell Rep*, 2019, 28(2): 295-301 e4.

(本文责编 郝丽芳)